AMEA-nın Xəbərləri (biologiya və tibb elmləri), cild 68, №2, səh. 12-22 (2013)

Активность И Субклеточная Локализация Изоформ Супероксиддисмутазы, Накопление Глицина Бетаина И Малондиальдегида У Генотипов Пшеницы При Долговременной Почвенной Засухе

И.М.Гусейнова, Д.Р.Алиева, Д.А.Алиев

Институт ботаники НАНА, Бадамдарское шоссе, 40, Баку AZ1073, Азербайджан;
E-mail: huseynova-i@botany-az.org

Устойчивость растений к засухе обеспечивается многокомпонентной антиоксидантной системой, вызывающей перестройки на физиологическом, клеточном и молекулярном уровне. В данной работе изучено влияние почвенной засухи на изменение активности и субклеточной локализации изоформ супероксиддисмутазы, уровни малонового диальдегида, глицин бетаина, а также содержание общих белков у двух контрастных генотипов твердой пшеницы (*Triticum durum* Desf.). Обнаружена зависимость уровня активности ферментов от генотипа пшеницы, продолжительности засухи и этапов развития растений. Реакция растений пшеницы на водный дефицит проявляется в накоплении глицинбетаина в листьях. При усилении засухи у неустойчивого генотипа Гарагылчыг-2 в отличие от устойчивого Баракатли-95, происходило значительное накопление МДА. Нативный электрофорез на полиакриламидном геле показал наличие 9 изоформ супероксиддисмутазы в листьях пшеницы во время засухи. Листья пшеницы содержат три различных типа СОД (Mn-, Fe-, Cu/Zn-СОД). Mn-СОД был обнаружен в митохондриальных фракциях, Fe-СОД - в хлоропластных фракциях, а Cu/Zn-СОД локализуется во всех субклеточных фракциях. Долговременная почвенная засуха сопровождалась экспрессией уровней этих изоформ. С использованием ингибиторного анализа (3мМ KCN и 5 мМ H_2O_2) в листьях пшеницы наблюдалось три изоформы Mn-СОД, одна изоформа Fe-СОД и пять изоформ Cu/Zn-СОД. Установлено, что в растениях подвергнутых водному стрессу в повышение активности СОД наибольший вклад вносит Mn-СОД. Вероятно, основная роль в детоксикации супероксид радикала во время долговременной почвенной засухи принадлежит этой изоформе.

Ключевые слова: засуха, супероксиддисмутаза, перекисное окисление липидов, глицинбетаин, малондиальдегид, *Triticum durum* Desf.

Сокращения: СОД – супероксиддисмутаза; ПОЛ – перекисное окисление липидов; МДА – малондиальдегид; ГБ – глицинбетаин, PMSF – фенилметилсульфонилфторид, ПВП – поливинилпирролидон, ПААГ – полиакриламидный гель.

ВВЕДЕНИЕ

Изменение климата является одной из важнейших международных проблем XXI века, которая выходит за рамки научной проблемы и представляет собой комплексную междисциплинарную проблему, охватывающую экологические, экономические и социальные аспекты устойчивого развития. Особенную обеспокоенность вызывает беспрецедентно высокая скорость глобального потепления, наблюдаемая в течении последних десятилетий.

Засуха – один из наиболее важных факторов внешней среды, действие

которого приводит к падению урожайности растений и поэтому проблема повышения засухоустойчивости растений является важной задачей перед современной науки. За последние несколько десятков лет во многих странах достигнуты значительные успехи по повышению засухоустойчивости растений (Li et al., 2009). Вместе с тем, не вызывает сомнения то, что устойчивость растений к дефициту воды могут развивать различные механизмы, эффективность которых зависит от климатических условий (Collins et al., 2008; Tester, Langridge, 2010; Ashraf, 2010). В связи с глобальными изменениями климата среди культурных растений, наверное, самое пристальное внимание исследователей привлекает пшеница. Пшеница - одна из часто возделываемых зерновых культур в Азербайджане, где засуха является основным стрессовым фактором, ограничивающим урожай зерна (Aliyev, 2001, 2012). В настоящее время влияние нарастающей почвенной засухи на физиолого-биохимические процессы пшеницы остается малоизученным. В связи с этим, большой интерес представляет исследование влияния засухи на физиолого-биохимические процессы у растений пшеницы в период онтогенеза. Селекция сортов пшеницы с повышенной устойчивостью к стрессовым факторам окружающей среды — важное звено в создании новых высокопродуктивных генотипов. В этом плане перспективными являются биотехнологические подходы, включающие идентификацию и модификацию генов, которые кодируют защитные белки. Недавние исследования выявили положительную корреляцию между способностью растений накапливать биомассу и их урожайностью не только в условиях нормальной обеспеченности водой, но и ее дефицита (Lafitte et al., 2007). В последнее время опубликовано много обзоров, посвященных физиологическим механизмам засухоустойчивости (Laffite et al., 2007; Fischer, Edmeades, 2010, Tester, Langridge, 2010). Исходя из этого, современные сорта могут сочетать высокую урожайность в благоприятных условиях с засухоустойчивостью (Burke et al., 2006; Laffite et al., 2007). Значительный вклад в формирование устойчивости растений к комплексному действию стресс-факторов вносят неспецифические защитные системы (Колупаев, Карпец, 2010). Среди них особое место занимает антиоксидантная система растений. Учитывая фундаментальную роль активных форм кислорода в ответных реакциях организмов и разнообразие механизмов защитных реакций, в последние годы активно обсуждаются вопросы возможного управления устойчивостью растений. Некоторые авторы обнаружили даже прямую связь между уровнем индукции антиоксидантной системы и степенью засухоустойчивости растений (Lascano et al., 2001; Helena M. Carvalho, 2008). Показано, что у различающихся по засухоустойчивости сортов пшеницы в физиологически нормальных условиях отличались активность аскорбатпероксидазы, содержание малонового альдегида и другие показатели, характеризующие антиоксидантный статус (Маменко, Ярошенко, 2012). После действия засухи эти отличия усиливались. Показано, что у устойчивого сорта пшеницы *Elite* в условиях засухи увеличивалась активность супероксиддисмутазы (СОД), аскорбатпероксидазы и глутатионредуктазы (Lascano et al., 2001). В то же время у неустойчивого сорта *Oasis* активность антиоксидантных ферментов не изменялась, либо снижалась. Основную роль в элиминации АФК играет супероксиддисмутаза (СОД; КФ, 1.15.1.1), которая снижает концентрацию супероксида (Мерзляк, 1989). Фермент присутствует в клетках растений там, где происходят окислительно-восстановительные

процессы. В клетках супероксиддисмутаза представлена тремя изоформами, которые отличаются входящими в состав активных центров ионами металлов: Cu/Zn-СОД, Mn-СОД и Fe-СОД. Сравнение данных о локализации разных форм СОД показывает, что наиболее изобильной в клетках растений является изоформа Cu/Zn-СОД. Она обнаружена во всех внутриклеточных компартментах: цитозоле (Herrnandez et al., 1993; Hurst et al., 2002), хлоропластах (Ogawa et al., 1996), митохондриях (Kuzniak et al., 2004), пероксисомах (Corpas et al., 2001), а также в апопласте (Ogawa et al., 1996). Mn-СОД присутствует в митохондриях (Kuzniak et al., 2004) и пероксисомах (Palma et al., 1998), а Fe-СОД – в хлоропластах (Navari-Izzo et al., 1998) и цитоплазме клубеньков некоторых бобовых (Moran et al., 2003). Однако точная субклеточная локализация различных типов изоформ СОД в клетках до сих пор изучена недостаточно. С учетом того, что СОД выступает первой линией ферментативной защитной системы, а ее суммарная активность обусловливается вкладом различных типов изоформ, изучение индивидуальных изменений ее активности в условиях засухи представляется весьма важным.

Целью работы было исследование роли антиоксидантной системы в проявлении конститутивной и индуцированной устойчивости растений пшеницы к долговременной почвенной засухе. Для этого сопоставляли активность и изоформенный состав ключевого фермента антирадикальной защиты - СОД и содержание МДА и ГБ при засухе. Исследования клеточной компартментации супероксиддисмутазы представляется важным для более глубокого понимания физиолого-биохимических механизмов, лежащих в основе устойчивости растений в условиях стресса.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Растительный материал. В данной работе были использованы два контрастных генотипа твердой (*Triticum durum* Desf.) пшеницы, взятые из Генефонда научно-исследовательского института земледелия: засухоустойчивый генотип Баракатли-95 и неустойчивый к засухе генотип Гарагылчыг-2. Растения были выращены в полевых условиях нормального водообеспечения и в условиях засухи. Обезвоживание достигалось прекращением полива, и опыты проводились во всех фазах онтогенеза.

Выделение субклеточных фракций. Все процедуры проводили при температуре 0-4°C. Выделение субклеточных фракций проводили методом дифференциального центрифугирования. Среда выделения хлоропластов содержала 0,35 М сахарозу, 5 мМ аскорбат натрия, 50 мМ Трис-HCl буфер (pH 7,8), 1 мМ $MgCl_2$, 5 мМ дитиотрейтол и 3 мМ цистеин. Для выделения митохондрий использовали среду, содержащую 0,35 М сахарозу, 0,02 М HEPES буфер (pH 8,0), 5 мМ ЭДТА, 5 мМ аскорбат натрия, 3 мМ цистеин, 5% БСА, 1 мМ $MgCl_2$. Цитоплазматическую фракцию получали после осаждения митохондрий.

Для получения общеклеточного экстракта пшеницы, листья растирали в среде, содержащей 1 мМ ЕДТА, 2 мМ фенилметилсульфонилфторида (PMSF), 1% ПВП, 100 мМ Na-фосфатного буфера (pH 7,8), 0,1% тритон X-100, затем фильтровали и центрифугировали в течении 20 мин при 15000 g. Полученный супернатант использовали для анализа антиоксидантных ферментов.

Определение активности СОД. Активность супероксиддисмутазы (СОД) определяли спектрофотометрически по методу (Beauchamp and Fridovich,1971). Общую активность СОД измеряли, используя метод, основанный на способности фермента конкурировать за супероксидные анионы с

нитросиним тетразолием, образующиеся, в результате аэробного взаимодействия НАДН и феназинметасульфата.

Определение изоформенного состава СОД. Для определения состава изоформ СОД применяли метод электрофореза в 10%-ном ПААГ в неденатурирующих условиях в трис-глициновом буфере (pH 8,3) при 4^0C, 3 часа при стабильном токе 30 мА. Визуализацию изоформ СОД проводили по методу (Parida et al., 2004). Для этого гель инкубировали в 100 мл 1,0 М трис-HCl буфере (pH 8,2), содержащем 10 мг нитросинего тетразолия, 75 мг ЭДТА-Na и 3 мг рибофлавина в течение 30 мин в темноте. Затем гель выдерживали на свету до появления светлых полос на фиолетовом фоне. Для селективного ингибирования изоформ СОД гели перед визуализацией инкубировали в растворах 3 мМ KCN (ингибирование Cu/Zn-СОД) и 5 мМ H_2O_2 (ингибирование Fe-СОД и Cu/Zn-СОД) в течении 20 мин (Miszalski et al., 1998).

Определение содержания глицинбетаина. Содержание глицинбетаина определяли по методу (Grieve and Grattan, 1983). Оптическую плотность окрашенного раствора измеряли на спектрофотометре при длине волны 365 нм. Количество бетаина определяли по калибровочной кривой, используя в качестве стандарта коммерческий препарат глицинбетаина (Serva, Германия).

Определение степени перекисного окисления липидов. Интенсивность ПОЛ оценивали по содержанию соединений, реагирующих с 2-тиобарбитуровой кислотой (в основном МДА), используя для анализа гомогенат, приготовленный на 0,1 М трис-HCl буфере (pH 7,6) (Cakmak and Horst, 1991). Абсорбцию супернатанта измеряли при 532 нм. При расчете концентрации МДА использовали коэффициент экстинкции 155/(мМ см).

Определение концентрации сухого вещества. Метод основан на высушивании навески пробы до постоянной массы, при температуре 103±2°C. Сухой остаток в процентах от первоначальной навески дает содержание сухих веществ в исследуемой пробе. Содержание сухого вещества рассчитывали по формуле:

$$\mathbf{C\ (\%) = (m_{сухой}/m_{сырой}) \cdot 100}$$

Определение количество белков. Количество белков определяли по методу (Sedmak and Grossberg, 1977). Для построения калибровочной кривой использовали бычий сывороточный альбумин.

Статистический анализ. В работе представлены данные 3-х опытов, проведенных в 3-кратной биологической повторности. Расчеты, построение графиков и их описание осуществляли с помощью приложений Microsoft Office Word 7 и Excel 7 для Windows XP.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Содержание сухого вещества является важнейшим показателем оценки качества растительного материала. Наши данные показали, что в условиях прогрессирующей почвенной засухи в листьях пшеницы содержание сухого вещества (в процентах от сырой массы) увеличилось (Таблица 1). Максимальное содержание сухого вещества в конце онтогенеза можно объяснить усиленной транспирацией в условиях высокой температуры воздуха и низкой влажности почвы. В то же время отношение сырая масса/сухая масса снизилось, что является показателем повышения интенсивности водного дефицита (Navarri-Izzo et al., 1993).

В наших исследованиях засуха индуцировала разнонаправленное изменение уровня растворимых белков во внутриклеточных компартментах листьев пшеницы по сравнению с контролем (Таблица 2). У устойчивого к стрессу сорта Баракатли-95 выявлено повышение синтеза белков, как в хлоропластах, так и в митохондриях. У чувствительного сорта Гарагылчыг-2 в

цитоплазме и митохондриях наблюдается инактивация, а в хлоропластах слабая активация синтеза белка. В конце онтогенеза водный стресс вызывал плавное повышение уровня белка во всех фракциях листьев по сравнению с началом вегетации. Таким образом, в период воздействия неблагоприятных факторов среды внутриклеточные процессы, в особенности связанные синтезом белков, формируются заново. Этот процесс у устойчивых генотипов, в сравнении с чувствительными, протекает более активно.

Результаты опытов показали, что растения пшеницы имеют различную устойчивость к недостаточному увлажнению в разные фазы своего развития, но недостаток влаги наиболее сильно сказывается в начале колошения. Обезвоживание листьев пшеницы сопровождается накоплением глицинбетаина и малонового диальдегида, фазным изменением активности супероксиддисмутазы, что свидетельствует о развитии окислительного стресса.

Малоновый диальдегид – является одним из важнейших показателей устойчивости растений к стрессу. Установлено, что при различных стрессовых воздействиях в клетках растений происходит торможение биохимических процессов, которое сопровождается усилением перекисного окисления липидов и накоплением МДА (Shao et al., 2005; Tatar and Gevrek, 2008; Ashraf et al., 2010). При стрессе уровень накопления МДА у разных по толерантности генотипов пшеницы разный. Проведенные нами исследования показали, что в условиях водного дефицита в листьях пшеницы наблюдалось увеличение содержания МДА как у устойчивого, так и у неустойчивого генотипа по сравнению с контролем (Таблица 3). При усилении засухи в листьях пшеницы Гарагылчыг-2 происходило значительное накопление МДА по сравнению с началом вегетации, тогда как у устойчивого сорта Баракатли-95 содержание МДА уменьшался, что свидетельствует о меньшем повреждающем влиянии засухи.

Как видно из табл. 3, у неустойчивого генотипа пшеницы повышение уровня ПОЛ было более значительным, что может быть связано с особенностями свойств мембранных структур клеток растений. Наивысшее содержание МДА наблюдается у чувствительного генотипа Гарагылчыг-2 в фазе молочной спелости, как в контроле, так и при засухе (7,7 и 8,3 мкмоль/г сырой вес, соответственно). Образующийся МДА способен взаимодействовать со свободными аминогруппами белков, компонентами фосфолипидов, инициировать появление в мембранах этилена. Все вместе это может привести к изменению свойств как мембран в целом, так и их отдельных компонентов в клетке при стрессовых воздействиях (Sairam and Saxena, 2000).

Таблица 1. Содержание сухого вещества (С %) и соотношение сухой и сырой биомассы ($m_{сырой}/m_{сухой}$) листьев пшеницы в онтогенезе при длительной почвенной засухе

№	Сорта пшеницы	Цветения		Молочной спелость		Восковая спелость	
		С	$m_{сырой}/m_{сухой}$	С	$m_{сырой}/m_{сухой}$	С	$m_{сырой}/m_{сухой}$
1	Баракатли-95	24,65	4,01	32,76	3,05	34,10	2,93
2	Гарагылчыг-2	34,13	2,92	37,77	2,64	36,03	2,44

Таблица 2. Содержание растворимых белков (мг/мл) в различных внутриклеточных компартментах листьев пшеницы в онтогенезе в условиях почвенной засухи

Генотипы	Стадии развития	Цитоплазма		Хлоропласт		Митохондрия	
		контроль	стресс	контроль	стресс	контроль	стресс
Баракатли-	Цветение	15,00±1,05	14,00±1,07	16,00±1,76	20,00±1,89	28,00±1,96	25,00±1,75

95	Молочная спелость	11,00±0,96	12,50±0,87	10,00±0,88	15,00±1,65	16,00±1,79	17,00±1,83
	Восковая спелость	14,00±0,98	19,00±1,33	36,00±2,51	35,00±2,45	38,00±2,54	39,00±2,73
Гагагылчыг-2	Цветение	13,00±0,92	11,00±0,89	21,00±1,91	22,00±1,96	15,50±1,11	23,00±1,97
	Молочная спелость	12,00±0,91	9,00±0,72	13,00±0,95	13,00±0,97	13,00±0,92	12,00±0,95
	Восковая спелость	18,00±1,98	18,00±1,96	37,00±2,39	40,00±2,81	50,00±2,54	35,00±2,38

Таблица 3. Динамика накопления малонового диальдегида (мкмоль/г сырой вес) в листьях генотипов пшеницы в различных фазах онтогенеза в условиях почвенной засухи

Генотипы	Варианты	Цветение	Молочная спелость	Восковая спелость
Баракатли-95	I	6,30±0,93	5,90±0,27	5,00±0,33
	II	7,20±0,81	6,80±0,79	6,00±0,71
Гарагылчыг-2	I	2,40±0,34	7,70±0,92	5,40±0,46
	II	3,40±0,39	8,30±0,97	7,90±0,95

I - контроль, II - засуха

Таблица 4. Динамика накопления глицинбетаина (мг/г сухой массы) в листьях генотипов пшеницы в онтогенезе в условиях почвенной засухи

Генотипы	Варианты	Цветение	Молочная спелость	Восковая спелость
Баракатли-95	I	1,79±0,26	7,16±1,07	9,05±1,35
	II	2,60±0,39	6,69±1,02	27,10±1,89
Гарагылчыг-2	I	3,18±0,47	3,91±0,58	8,20±1,12
	II	6,10±0,91	7,21±1,09	16,80±1,78

I - контроль, II - засуха

Одной из стратегий адаптации растений к разнообразным условиям окружающей среды является накопление совместимых осмолитов – осмопротекторов (Chen and Murata, 2002). Одним из наиболее эффективных осмопротекторов является глицинбетаин (ГБ) – четвертичное соединение аммония. В настоящее время общепризнанно, что глицинбетаин является потенциальным осмопротектантом, защищающим растительные клетки от засухи и засоления (Chen and Murata, 2008; Girl, 2011). Особенности строения ГБ позволяют ему взаимодействовать как с гидрофобными, так и с гидрофильными доменами макромолекул без нарушения клеточных функций (Sakamoto and Murata, 2002). Известно, что ГБ защищает клетки путем поддержания осмотического баланса между внутриклеточной и внеклеточной средой (Robinson and Jones, 1986; Ma и др., 2007), стабилизации четвертичной структуры белков, таких как ферменты антиоксидантной защиты и белки мембран, а также другие функциональные единицы, подобные кислород-выделяющему комплексу ФС II (Rajasekaran et al., 1997). Исходя из этого, нами было изучено содержание ГБ в листьях пшеницы при нормальном водообеспечение и водном дефиците. При этом между устойчивыми и неустойчивыми генотипами проявлялись различия в содержании глицинбетаина (Таблица 4).

Диаграмма отражает динамику колебаний уровня глицинбетаина в клетках пшеницы в течении онтогенеза. Содержание глицинбетаина в клетках возрастало и превышало показатели, измеренные в нормальных условиях (Таблица 4). При этом у устойчивого генотипа уровень ГБ был выше, чем у неустойчивого. В конце онтогенеза содержание ГБ возрастало примерно в 10 раз у сорта Баракатли-95 и в 2,75 раза у сорта Гарагылчыг-2. После долговременной почвенной засухи накопление глицинбетаина в листьях сорта Баракатли-95 было в 3 раза больше по сравнению с контролем и почти в 10 раз выше по сравнению с началом вегетации. Эти данные говорят о том,

что реакция растений пшеницы на водный дефицит проявляется в накоплении глицинбетаина в листьях. Аккумуляция глицинбетаина в ответ на дефицит воды является одной из наиболее эффективных защитных реакций растений. При условиях стресса глицинбетаин может одновременно выступать как соединение: а) регулирующее внутриклеточный осмотический потенциал; б) контролирующее pH цитоплазмы; в) стабилизирующее структуру клеточных мембран (Rajasekaran et al., 1997; Allakhverdiev et al., 2003). В то же время накопление глицинбетаина может быть следствием разнонаправленных процессов: повышения биосинтеза; снижения деградации; изменения транспорта; разложения обогащенных глицинбетаином протеинов. Первые два процесса возможны в случае активного метаболизма клеток, адаптации к окружающим стрессовым условиям. Основываясь на полученных экспериментальных данных, можно предположить, что сверхнакопление ГБ повышает устойчивость к водному дефициту растений пшеницы благодаря регуляции ионного гомеостаза и обезвреживанию АФК. В литературе имеются данные о том, что в некоторых растениях, таких как сахарная свекла (*Beta vulgaris*), шпинат (*Spinacia oleracea*), ячмень (*Hordeum vulgare*), пшеница (*Triticum aestivum*), и сорго (*Sorghum bicolor*) в ответ на стресс накапливается ГБ (Weimberg *et al.*, 1982; Fallon and Phillips, 1989; McCue and Hanson, 1990; Rhodes and Hanson, 1993; Yang *et al.*, 2005). При этом устойчивые генотипы накапливают больше ГБ по сравнению с неустойчивыми сортами.

Одной из самых первых неспецифических ответных реакций клеток на абиотический стресс, в том числе и на долговременную засуху, является генерация активных форм кислорода. Избыточное их образование может происходить в митохондриях и хлоропластах (при переносе электронов по электронтранспортным цепям), в эндоплазматическом ретикулуме и в цитоплазме. Супероксиддисмутаза является одним из ключевых компонентов системы защиты клеток от окислительного стресса. В процессе адаптации растений к окислительному стрессу уровень содержания СОД может изменяться в зависимости от вида растения, стадии его развития и степени стрессорного воздействия (Alscher et al., 2002; Miszalski et al., 1998). Дефицит почвенной влаги, изменяя скорость и направленность ферментативных процессов, приводит к качественным и количественным изменениям активности СОД в листьях. Динамика активности СОД в период онтогенеза представлена на рисунке 1.

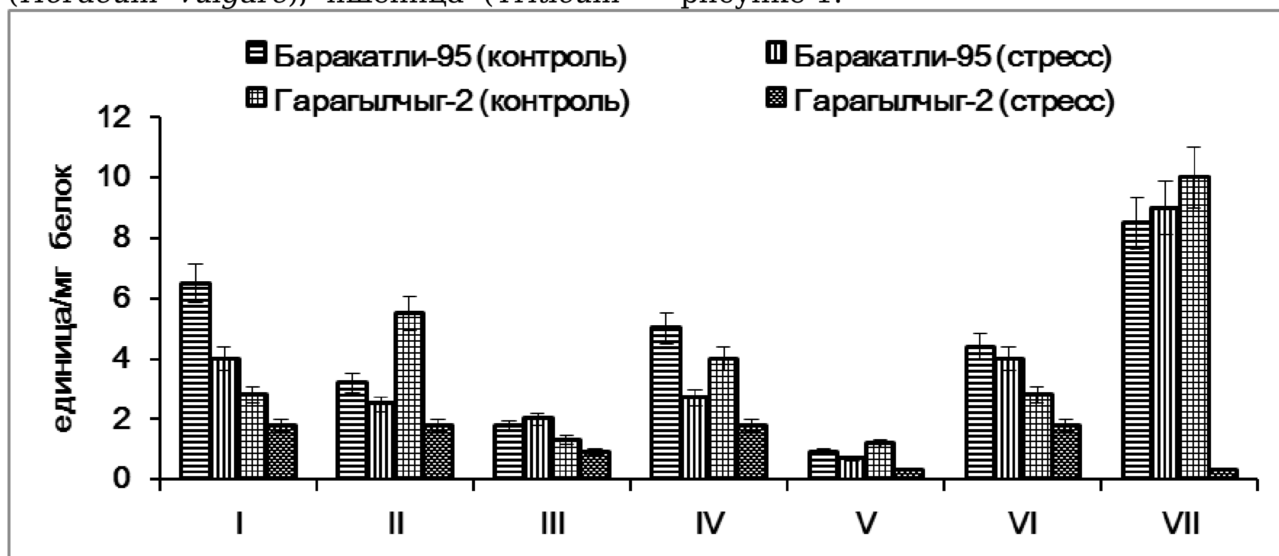


Рисунок 1. Изменение активности СОД (ед.активности/мг белка) в листьях устойчивого (Баракатли-95) и чувствительного (Гарагылчыг-2) сорта пшеницы при действии долговременной почвенной засухи. I – выход в трубку, II – начала колошения, III – конец колошения, IV – начало цветения, V – конец цветения, VI – молочная спелость, VII –

восковая спелость

Судя по рис. 1, в изменении активности СОД не выявляется определенная корреляция. Наибольший уровень активности фермент имел в начале засухи, что, по-видимому, обусловлено началом развития стресса, вызванного дефицитом воды в почве. Активность фермента снижалась в конце цветения как у устойчивого (Баракатли-95), так и у чувствительного (Гарагылчыг-2) сорта. В восковой фазе и в фазе молочной спелости стимулировалась активность СОД у засухоустойчивого генотипа Баракатли-95, тогда как активность фермента у неустойчивого генотипа Гарагылчыг-2 значительно повысилось в контрольных вариантах и резко снизилось у стрессовых. Полученные нами данные согласуются с имеющимися литературными данными. В литературе имеются данные о том, что при водном дефиците (Iturbe-Ormaetxe et al., 1998), солевом стрессе (Santos et al., 2001) и в условиях засухи (Zhang et al., 1994) происходит снижение активности СОД.

Анализ изоферментных профилей супероксиддимутазы в листьях, различающихся по засухоустойчивости генотипов пшеницы, осуществлен путем нативного электрофореза на 10%-ном ПААГ (Рис.2). При электрофоретическом разделении множественных молекулярных форм СОД не наблюдали видимых качественных различий (наличия дополнительных или отсутствия определенных полос на электрофореграмме) по сравнению контролем.

При этом Mn-СОД была представлена тремя полосами, Fe-СОД одной тонкой полосой и Cu/Zn-СОД была представлена широкой полосой. Эффект «размытого» пятна на зимограммах обычно создают изоферменты, зоны которых в геле расположены очень близко. В нашем случае такой эффект создавали три и два близко расположенных изоформ Cu/Zn-СОД. Следует отметить, что множественность изоформ Cu/Zn-СОД является отличительной чертой клеток растений (Бараненко, 2006).

Поскольку в листьях пшеницы присутствуют несколько изоформ СОД, вносящих различный вклад в общую активность фермента, было важно оценить вклад каждой изоформы в общую активность фермента при действии почвенной засухи. Результаты, полученные с помощью нативного электрофореза (Рис. 2), позволяют предположить, что в растениях подвергнутых водному стрессу, в повышение активности СОД вносит наибольший вклад Mn-СОД, который присутствует в митохондриях. Вероятно, основная роль в детоксикации супероксид радикала принадлежит этой изоформе (Kliebenstein et al., 1998). Было показано преобладание изоформ Mn-СОД, а активность Fe-СОД изоформы, которая присутствует в хлоропластах, оценивалась не более чем в 1–5% от общей активности СОД, что значительно затрудняло ее визуальную идентификацию. В цитозоле и пластидах, где локализуется Cu/Zn–СОД, развитие окислительного стресса, вызванного засухой, происходит в незначительной степени. Об уменьшении активности СОД и изменении ее изоферментного состава при стрессовых воздействиях сообщалось и в литературе (Smirnoff, 1993; Gallego et al., 1996). Возможно, это обусловлено ингибированием активности Cu/Zn-СОД, присутствующей практически во всех компартментах клетки, под влиянием H_2O_2 (Bowler et al., 1992; Бараненко, 2006).

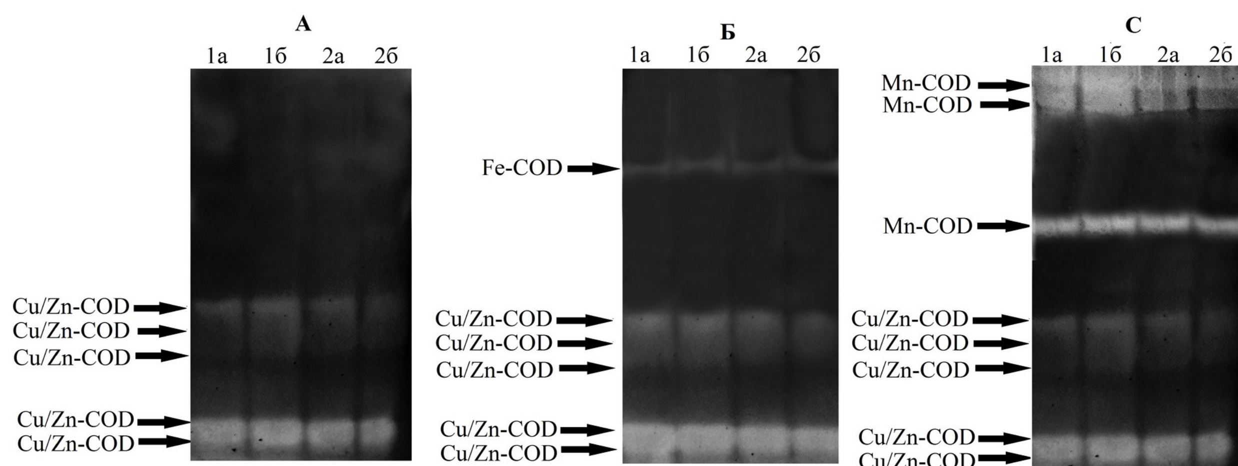


Рисунок 2. Идентификация различных изоформ супероксиддисмутазы в клеточной компартменте листьев пшеницы в условиях почвенной засухи: А – цитоплазма, Б – хлоропласт, С – митохондрия. а – полив, б – засуха; 1- Баракатли - 95, 2 – Гарагылчыг - 2. Электрофорез был проведен в 10%-ном ПААГ в трис-глициновом буфере (рН 8,3), при 4ºС, 3 часа при стабильном токе 30 мА. Количество нанесенного белка составляло 45 мкг на дорожку геля.

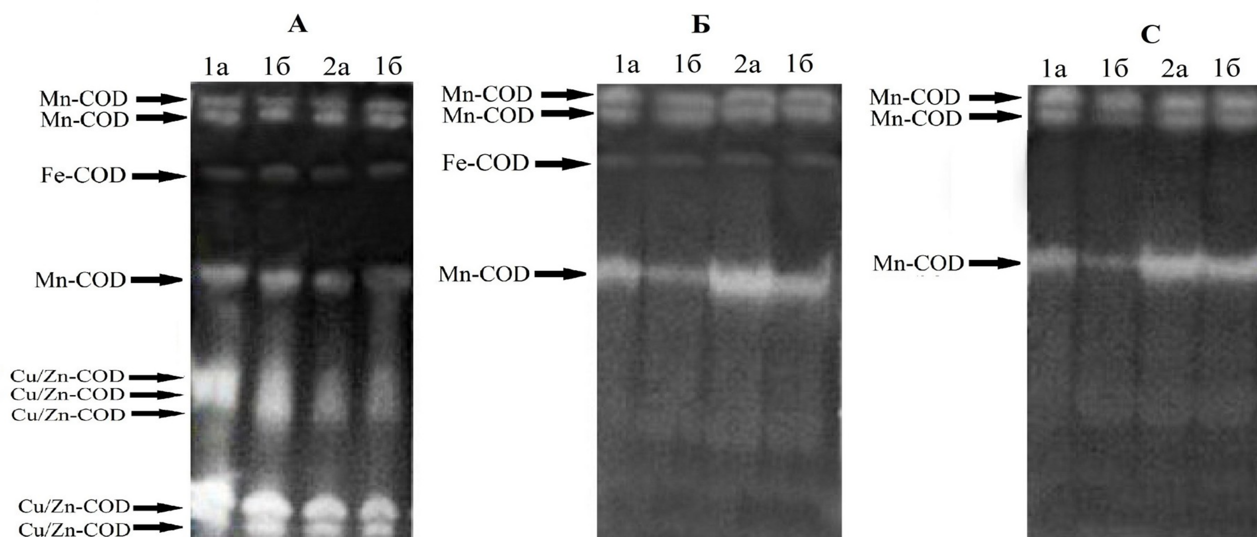


Рисунок 3. Ингибиторный анализ изоферментного спектра СОД листьев пшеницы в условиях почвенной засухи.
а – полив, б – засуха; 1- Баракатли - 95, 2 – Гарагылчыг -2. А – общеклеточный экстракт, Б – в присутствие KCN, С – в присутствие H_2O_2. Электрофорез был проведен в 10%-ном ПААГ в трис-глициновом буфере (рН 8,3), при 4ºС, 3 часа при стабильном токе 30 мА. Количество нанесенного белка составляло 45 мкг на дорожку геля.

Таким образом, в стресс-индуцируемое повышение общей активности СОД наибольший вклад вносит Mn-СОД. Ранее было доказано, что сильное увеличение как митохондриальной, так и перексисомной изоформ Mn-СОД индуцируется в растительных тканях в условиях стресса (Racchi et al., 2001). Таким образом, можно предположить, что выявленная нами в исследованных образцах высокая активность Mn-СОД является следствием защиты растений от окислительного стресса в условиях почвенной засухи.

Поскольку изоформы СОД отличаются разной устойчивостью к ингибиторам, определение типа изоформ было проведено с помощью ингибиторного анализа, который показал, что в растениях пшеницы содержаться три типа изоформ одного

из ключевых антиоксидантных ферментов супероксиддисмутазы: Mn-, Fe-, Cu/Zn-содержащие СОД. (Рис. 3A).

В присутствие 3 мМ KCN наблюдалось полное ингибирование активности Cu/Zn-СОД (Рис. 3Б). Обработка гелей перекисью водорода, инактивирующей Cu/Zn-СОД и Fe-СОД, показала, что высокомолекулярные изоформы представляют собой изоэнзимы Mn-СОД, которые сохраняют высокую активность во время засухи (Рис. 3С). Так как данные изоформы не ингибируются цианидом калия и перекисью водорода, было сделано предположение об их принадлежности к Mn-содержащим изоформам (Streller et al., 1994).

Таким образом, в растениях подвергнутых водному стрессу, в повышение активности СОД вносит наибольший вклад Mn-СОД. Вероятно, основная роль в детоксикации супероксид радикала во время долговременной почвенной засухи принадлежит этой изоформе.

Обобщая полученные результаты, следует отметить, что растения сорта Баракатли-95, вероятно, имеют более эффективную систему антиоксидантной защиты, помогающую им противостоять окислительному стрессу.

Таким образом, функциональное состояние супероксиддисмутазы, а также уровни малонового диальдегида и глицинбетаина могут стать важным инструментом для определения засухоустойчивости генотипов пшеницы.

БЛАГОДАРНОСТЬ

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта (EIF-2010-1(3)-82/48/3) Фонда развития науки при Президенте Азербайджанской Республики.

ЛИТЕРАТУРА

Бараненко В.В. (2006) Супероксиддисмутаза в клетках растений. Цитология, **48:** 465-474.

Колупаев Ю.Е., Карпец Ю.В. (2010) Формирование адаптивных реакций растений на действие абиотических стрессоров. Киев: Основа, 351 с.

Ма С.Л., Ван Я.Ц., Си С.Л., Ван Ч., Ван В. (2007) Обработка глицинбетаином снижает вредное влияние засухи на растение. Физиология растений, **54:** 534-541.

Маменко Т.П., Ярошенко О.А. (2012) Реакція антиоксидантної системи контрастних за посухостійкістю сортів озимої пшениці на водний дефіцит. Физиология и биохимия культурных растений, **44(4):** 323-330.

Мерзляк М.Н. (1989) Активированный кислород и окислительные процессы в мембранах растительной клетки. Итоги науки и техники. Сер. Физиология растений. М.: ВИНИТИ, 6: 167 с.

Aliev J.A. (2001) Physiological bases of wheat breeding tolerant to water stress. Proceedings of the 6th International Wheat Conference, Budapest, Hungary, 2000. In: Wheat in a Global Environment (Bedo Z., Lang L., eds.), Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Boston, London **9:** 693-698.

Aliyev J.A. (2012) Physiological and molecular bases of drought tolerance in wheat (*Trticum* L.) genotypes. In: D.F. Neves, J.D. Sanz (eds.) Environmental Science, Engineering and Technology. Drought: New Research, Nova Science Publishers, Inc., New York, **2:** 47-95.

Allakhverdiev SI, Hayashi H, Nishiyama Y, Ivanov AG, Aliev JA, Klimov VV, Murata N, Carpemtier R (2003) Glycinebetaine protects the D1/D2/Cyt *b 559* complex of photosystem II against photo-induced and heat-induced inactivation. J Plant Physiol., **160:** 41-49.

Alscher R.G., Erturk N., Heath L.S. (2002) Role superoxidedismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants. Exp. Botany, **53:** 1331-1341

Ashraf M. (2010) Inducing drought tolerance in plants: Recent advances. Biotechnol. Adv., **28:** 169-183.

Ashraf M.A., Ashraf M. and Ali Q. (2010) Response of two genetically diverse wheat cultivars to salt stress at

different growth stages: leaf lipid peroxidation and phenolic contents. Pak. J. Bot., **42(1):** 559-565.

Beauchamp C. and Fridovich I. (1971) Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. Analytical Biochemistry, **44:** 276–287.

Bowler C., Van Montagu M., Inze D. (1992) Superoxide dismutase and stress tolerance. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol., **43:** 83-116.

Burke E.J., Brown S.J., Christidis N. (2006) Modeling the recent evolution of global drought and projections for the twenty-first century with the Hadley Centre climate model. J. Hydrometeorol., **7:** 1113–1125.

Cakmak I, Horst W. (1991) Effect of aluminium on lipid peroxidation, superoxide dismutase, catalase, and peroxidase activities in root tips of soybean (*Glycine max*) // Physiol Plant., **83:** 463-468.

Chen T.H., Murata N. (2002) Enhancement of tolerance of abiotic stress by metabolic engineering of betaines and other compatible solutes. Curr. Opin. Plant Biol., **5:** 250-257.

Chen T.H., Murata N. (2008) Glycinebetaine: an effective protectant against abiotic stress in plants. Trends Plant Sci., **13:** 499-505.

Collins N.C., Shirley N.J., Saeed M., Pallota M., Guslafson J.P. (2008) An *ALMT1* gene cluster controlling aluminum tolerance at the Ali 4 locus of rye (*Cecale cereal* L.). Genetics, **179:** 669-682.

Corpas F.J., Barroso J.B., del Rio L.A. (2001) Peroxisomes as a source of reactive oxygen species and nitric oxide signal molecules in plant cells. Trends in Plant Science, **6(4):** 145-150.

Fallon, K.M. and Phillips R. (1989) Responses to water stress in adapted and unadapted carrot cell suspension cultures. J. Expt. Bot., **40:** 681–687.

Fischer G., Tubiello F., Van Velhuizen H., Wiberg D. (2006) Climate change impacts on irrigation water requirements: effects of mitigation, 1990–2989. Technol. Forecasting Soc. Change **74:** 1083–1107.

Fischer R.A., Edmeades G.O. (2010) Breeding and cereal yield progress. Crop Science, **50:** 85–98.

Gallego S.M., Benavides M.P., Tomaro M.L. (1996) Effect of heavy metal ion excess on sunflower leaves: evidence for involvement of oxidative stress. Plant Sci. **121:** 151-159.

Girl J. (2011) Glycinebetaine and abiotic stress tolerance in plants. Plant Signaling and Behavior, **6(11):** 1746-1751.

Greive, C.M. and Grattan, S.R. (1983) Rapid assay for determination of water-soluble quaternary amino compounds. Plant Soil, **70:** 303-307.

Helena M. Carvalho. (2008) Drought stress and reactive oxygen species: Production, scavenging and signaling. Plant Signaling and Behavior, **3(3):** 156-165.

Herrnandez J.A., Corpas F.J., Gomez L.A., del Rio L.A. (1993) Salt induced oxidative stress mediated by activated oxygen species in pea leaf mitochondria. Plant Physiol., **89:** 103-110.

Hurst A., Grams T., Ratajczak R. (2002) Effects of salinity, high irradiance, ozone, and ethylene on mode of photosynthesis, oxidative stress and oxidative damage in the C3/CAM intermediate plant *Mesembryanthemum crystallinum* L. Plant, Cell & Environ. **27:** 187-197.

Iturbe-Ormaetxe I., Escuredo P., Arrese-Igor C., Becana M. (1998) Oxidative damage in pea plants exposed to water deficit or paraguat. Plant Physiol., **116:** 173-181.

Kliebenstein D.J., Monde R., Last R.L. (1998) Superoxide dismutase in Arabidopsis: an eclectic enzyme family with disparate regulation and protein localization. Plant Physiol., **118:** 637–650.

Kuzniak E., Sklodowska M. (2004) The effect of Botrytis cinerea infection on the antioxidant profile of mitochondria from tomato leaves. J. Exp. Bot., **55:** 605-612.

Lafitte H.R, Yongsheng G, Yan S, Li Z.K. (2007) Whole plant responses, key processes, and adaptation to drought stress: the case of rice. J Exp. Bot., **58(2):** 169-175.

Lascano H.R., Antonicelli G.E., Luna C.M., Melchior-re M.N., Gomez L.D., Racca R.W., Trippi V.S., Casano L.M. (2001) Antioxidant system response of different wheat cultivars under drought: Field and in vitro studies. Aus. J. Plant Physiol., **28:** 1095-1102.

Lascano HR., Antonicelli GE., Luna CM., Melchiorre MN., Gomez LD., Racca RW., Trippi VS., Casano LM. (2001) Antioxidant system response of different wheat cultivars under drought: field and in vitro studies. Aus. J. Plant Physiol., **28:** 1095-1102.

Li Y.P., Ye W., Wang M., Yan X.D. (2009) Climate change and drought: a risk assessment of crop-yield impacts. Clim. Res. **39:** 31–46.

McCue K.F., Hanson A.D. (1990) Drought and salt tolerance: towards understanding and application. Trends in Biotechnology, **8:** 358–362.

Miszalski Z., Slesak I., Niewiadomska E., Baczek-Kwinta R., Luttge U., Ratajczak R. (1998) Subcellular localization and stress responses of superoxide dismutase isoforms from leaves in the C_3-CAM intermediate halophyte *Mesembryanthemum crystallinum* L. Plant Cell Env., **21:** 169-179.

Moran J.F., James E.K., Rubio M.C., Robert G.S., Klucas V., Becana M. (2003) Functional characterization and expression of a cytosolic iron-superoxide dismutase from cowpea root nodules. Plant Physiol., **133:** 773-782.

Navari-Izzo F., Quartacci M. F., Pinzino C., Vecchia F.D., Sgherri C.L.M. (1998) Thylakoid bound and stromal antioxidative enzymes in wheat treated with excess copper. Physiol. Plant., **104:** 630-638.

Navari-Izzo F., Quartacci M.F., Melfi D., Izzo R. (1993) Lipid composition of plasma membranes isolated from sunflower seedlings under water stress. Physiol. Plant., **87:** 508-514.

Ogawa K., Kanematsu S., Asada K. (1996) Intra and extra-cellular localization of “cytosolic” CuZn-superoxide dismutase in spinach leaf and hypocotyls. Plant Cell Physiol., **37:** 790-799.

Palma J.M., Huertas E.L., Corpas F.J., Sandalio L.M., Gomez M., Del Rio L.A. (1998) Peroxisomal manganese superoxide dismutase: purification and properties of the isozyme from pea leaves. Physiol. Plant., **104:** 720-726.

Parida A., Das A., Mohanty P. (2004) Defense potentials to NaCl in a mangrove *Bruguiera parviflora*: differential changes of isoform of some antioxidative enzymes. J. Plant Physiol., **161:** 531-542.

Racchi M.L., Bagnoli F., Balla I., Daut S. (2001) Differential activity of catalase and superoxide dismutase in seedlings and *in vitro* micro propagated Oak (*Quercus robur* L.). Plant Cell Reports, **20:** 169-174.

Rajasekaran I.R., Kriedemann P.F., Aspinall D., Paleg I.G. (1997) Physiological significance of proline and glycinebetaine: Maintaining photosynthesis during NaCl stress in wheat. Photosynthetica, **34:** 357-366.

Rhodes D, Hanson AD. (1993) Quaternary ammonium and tertiary sulfonium compounds in higher plants. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology, **44:** 357–384.

Robinson S.P., Jones G.P. (1986) Accumulation of glycinebetaine in chloroplast provides osmotic adjusments during salt stress. Aust. J Plant Physiol., **13:** 659-668.

Sairam R.K. and Saxena D.C. (2000) Oxidative stress and antioxidants in wheat genotypes: Possible mechanism of water stress tolerance. J Agron. Crop Sci., **184(1):** 55-61.

Sakomoto A., Murata N. (2002) The role of glycinebetaine in the protection of plants from stress: Clues from transgenic plants. Plant Cell Environ., **25:** 163-171.

Santos C., Campos A., Azevedo H., Caldeira G. (2001) In situ and in vitro senescence induced by KCl stress: nutritional imbalance, lipid peroxidation and antioxidant metabolism. J. Exp. Bot., **52:** 351-360.

Schafleitner R., Gaudin A., Rosales R.O.G., Aliaga C.A.A., Bonierbale M. (2007) Proline accumulation and real time PCR expression analysis of genes

encoding enzymes of proline metabolism in relation to drought tolerance in Andean potato. Acta Physiol. Plant **29:** 19-26.

Sedmak J.J., Grossberg S.E. (1977) F rapid, sensitive and versatile assay for protein using Coomassie brilliant blue G 250. Anal. Biochem., **79:** 544-552.

Shao H.B., Liang Z.S. and Shao M.A. (2005) Changes of some anti-oxidative enzymes under soil water deficits among 10 wheat genotypes at maturation stage. Colloids Surf. B: Biointerfaces, **45:** 7-13.

Smirnoff N. (1993) The role of active oxygen in response to water deficit and desiccation. New Phytol., **125:** 27-58.

Streller S., Kromer S., Wingsle G. (1994) Isolation and purification of mitochondrial Mn-superoxide dismutase from the gymnosperm *Pinus sylvestris* L. Plant Cell Physiol., **35:** 859–867.

Tatar O. and Gevrek M. (2008) Influence of water stress on proline accumulation, lipid peroxidation and water content of wheat. Asian Journal of Plant Sciences, **7(4):** 409-412.

Tester M and Langridge P. (2010) Breeding technologies in increase crop production in a changing world. Science, **327:** 818-822.

Weinberg R., Lerner H.R., Poljakoff-Mayber A. (1982) A relationship between potassium and proline accumulation in salt-stressed Sorghum bicolor. Physiol. Plant., **55:** 5–10.

Yang X, Liang Z, Lu C. (2005) Genetic engineering of the biosynthesis of Glycinebetaine enhances photosynthesis against high temperature stress in transgenic tobacco plants. Plant Physiol., **138:** 2299–2309.

Zhang J., Kirkham M. (1994) Drought-stress-induced changes in activities of superoxide dismutase, catalase and peroxidase in wheat species. Plant Cell Physiol., **35:** 785-791.

Davamlı Torpaq Quraqlığı Zamanı Buğda Genotiplərində Superoksiddismutaza Fermentinin Aktivliyi Və Izoformalarının Hüceyrədə Lokalizasiyası, Qlisinbetain Və Malondialdehidinin Sintezi

İ.M.Hüseynova, D.R.Əliyeva, C.Ə.Əliyev

AMEA Botanika İnstitutu

Bitkilərin quraqlığa davamlılığı fizioloji, hüceyrə və molekulyar səviyyələrdə dəyişikliyə səbəb olan çoxsaylı anntioksidant sistemləri hesabına təmin olunur. Torpaq quraqlığının buğda yarpaqlarında superoksiddismutaza fermentinin aktivliyinə və hüceyrədə lokalizasiyasına, malondialdehidinin, qlisinbetainin miqdarına və hüceyrənin ümumi zülal tərkibinə təsiri öyrənilmişdir. Müəyyən olunmuşdur ki, fermentin aktivliyi buğdanın sortundan, quraqlığın davametmə müddətindən və yarpaqların inkişaf mərhələsindən asılıdır. Buğda bitkisi su çatışmazlığına yarpaqlarda qlisinbetainin yığılmas ilə cavab verir. Quraqlıq gücləndikdə davamsız Qaraqılçıq genotipində davamlı Bərəkətli-95-dən fərqli olaraq MDA-nın əhəmiyyətli dərəcədə yığılması baş verir. Nativ PAAG metodunun köməyi ilə quraqlığa məruz qalmış bugda yarpaqlarında SOD-un 9 izoenzimi aşkarlanmışdir. Göstərilmişdir ki, buğda bitkisində SOD-un hər üç izoforması (Mn-, Fe-, Cu/Zn-SOD) fəaliyyət ğüstərir. Mn-SOD mitoxondri fraksiyasında, Fe-SOD xloroplastda, Cu/Zn-SOD isə bütün hüceyrə fraksiyalarındada müşahidə olunmuşdur. Uzunmüddətli quraqlıq bu izoformaların ekspressiyasının dəyişməsi ilə müşayiət olunur. İnhibitor analizinin nəticələri (3мМ KCN и 5 мМ H_2O_2) buğdada Mn-SOD-un 3, Fe-SOD-un 1, Cu/Zn-SOD-un isə 5 izoformasının olduğunu təsdiq etmişdir. Müəyyən olunmuşdur ki, su stresinə məruz qalmış bitkilərdə superoksid radikallarının detoksifikasiyasında əsas rol Mn-SOD-a məxsusdur.

Açar sözlər: *quraqlıq, superoksiddismutaza, lipidlərin peroksidləşməsi, qlisinbetain,*

malondialdehidi, Triticum durum Desf.

Activity And Subsellular Localization Of Isoforms Of Superoxide Dismutase, Accumulation Of Glycine Betaine And Malondialdehyde In Wheat Genotypes Subjected To Continuous Soil Drought

I.M. Huseynova, D.R. Aliyeva, J.A. Aliyev

Institute of Botany, ANAS

Drought resistance is provided by multicomponent antioxidant system, causing rearrangements at the physiological, cellular and molecular levels. Experiments with two durum (*Triticum durum* Desf.) wheat genotypes with contrasting drought tolerance were carried out to study the effect of soil drought on changes in activities and subcellular localization of isoforms of superoxide dismutase, levels of malondoaldehyde, glycine betaine and total protein content. The level of the enzyme activity appeared to depend on the wheat genotypes, duration of drought and stages of the plant growth. Wheat responds to water deficit through accumulation of glycine betaine in leaves. Significant accumulation of MDA occurred in the sensitive variety Gragylchig-2 contrary to the tolerant Barakatli-95 under severe stress conditions. Native polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) revealed the presence of 9 isoforms of superoxide dismutase in wheat leaves during drought. Wheat leaves contain three different types of SODs (Mn-, Fe-, Cu/Zn-SOD) Mn-SOD was found in the mitochondrial fractions, Fe-SOD in the chloroplast fraction and Cu/Zn-SOD is localized in all subcellular fractions. The long-term drought was accompanied by the expression of the levels of these isoforms. Three isoforms of Mn-SOD, one isoform of Fe-SOD and five of Cu/Zn-SOD were observed in wheat leaves using 3mM KCN and 5 mM H_2O_2 as selective inhibitors. Mn-SOD was established to make the most contribution to increase of SOD activity. It seems that this isoform plays a major role in the scavenging of superoxide radicals during a long-term drought.

Key words: *drought, superoxide dismutase, lipid peroxidation, glycine betaine, malondialdehyde, Triticum durum* Desf.